

УДК 582.261.1:577.152.34:546.732:57.044

**ВЛИЯНИЕ КОБАЛЬТА (II) НА ЖЕЛАТИНОЛИТИЧЕСКУЮ
И КАЗЕИНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ *PINNULARIA DIATOMOPHYTA***

А.И. Ничипорук, 3 курс

Научный руководитель – **И.А. Ильючик**, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

Диатомовые водоросли представляют собой доминирующую группу микроскопических эукариотических организмов в водных экосистемах, обеспечивая до 25 % мировой первичной продукции и играя фундаментальную роль в глобальных циклах углерода, кремния и азота [1, с. 1]. Среди них представители рода *Pinnularia* выделяются особой экологической пластичностью, демонстрируя способность к выживанию в экстремальных условиях [2, с. 734].

Кобальт, являясь эссенциальным микроэлементом, при превышении физиологических норм становится мощным ингибитором, провоцирующим окислительный стресс и угнетение ферментативных систем живых организмов [3, с. 13]. Применительно к диатомовым водорослям чувствительность к ионам металлов представляет особый интерес в контексте изучения их протеолитической активности. Ранее нами было выявлено наличие нейтральных и щелочных протеаз в гомогенатах клеток *P. diatomophyta*, зависящих от pH среды [4, с. 297].

Цель работы выявить влияние ионов кобальта *in vitro* на протеолитическую активность гомогенатов клеток диатомовой водоросли пиннулярии.

Исследования проведены на культуре диатомовой водоросли *P. diatomophyta*. Условия выращивания водоросли, забор ее биомассы осуществляли как ранее описано нами [4, с. 296].

К биомассе пиннулярии $0,05 \pm 0,01$ г дополнительно вносили 1 мл дистиллированной воды и гомогенизировали на льду в течение 4-х минут. Хлорид кобальта (II) вносили к гомогенату клеток в соотношении 1:1 в конечных концентрациях 10^{-8} – 10^{-2} М. В контрольный образец соль кобальта не добавляли.

Протеолитическую активность полученных гомогенатов определяли по лизису казеина и желатина в тонком слое агарового геля [5, с. 16]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали буферные растворы: 0,15 М трис-НСl, pH 7,5 и 9,0, 0,2 М ацетатный, pH 5,5 и раствор 0,15 М NaCl, pH 7,5 [6]. Инкубировали пластины с нанесенными образцами по 10 мкл при 37 °С в течение 20 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой пластин 1 н хлорной кислотой.

Исследования проведены пятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с вычислением t-критерия Стьюдента.

Воздействие ионов кобальта на активность протеаз гомогенатов клеток *P. diatomophyta*, зависела от концентрации соли кобальта и значения pH среды. Казеинолитическая активность протеаз водоросли в ряде случаев значительно превышала желатинолитическую (таблица).

Таблица – Площади зон расщепления казеина и желатина протеазами гомогенатов клеток *Pinnularia diatomophyta* в присутствии ионов кобальта, n = 5

Концентра- ция CoCl ₂ , М	Буферные растворы							
	0,15 М NaCl, pH=7,5		0,15 М трис-HCl, pH =9,0		0,15 М трис-HCl, pH =7,5		0,2 М ацетатный, pH =5,5	
	Белки-субстраты							
	Желатин	Казеин	Желатин	Казеин	Желатин	Казеин	Желатин	Казеин
	Площадь зон расщепления, мм ²							
Контроль	61,2±3,2	214,5±6,7	45,5±3,5	90,1±2,7	64,5±2,3	157,6±5,4	38,5±3,3	51,3±2,2
10-8	94,2±4,3*	256,2±8,1*	90,3±6,6*	134,2±5,0*	92,3±2,1*	164,2±6,0	36,1±3,2	49,2±2,3
10-7	78,4±4,2*	199,1±8,8	56,2±2,5*	107,1±5,6*	76,4±4,7	135,2±5,2*	28,3±2,4	35,7±1,6*
10-6	65,7±3,8	167,3±6,4*	47,1±4,8	90,4±4,0	62,5±3,2	108,5±4,2*	23,6±4,3	24,5±1,7*
10-5	51,3± 4,8	146,2±6,0*	30,3±2,8*	81,3±3,5	56,3±2,6*	94,1±4,0*	19,5±5,2*	20,5±1,4*
10-4	40,5±3,6*	130,4±5,7*	24,5±4,5*	72,2±4,8*	45,5±3,3*	80,3±3,9*	16,5±1,6*	16,2±1,3*
10-3	32,2±3,4*	119,2±5,0*	22,5±5,0*	59,2±4,0*	35,1±4,7*	71,5±3,0*	12,3±3,6*	14,6±0,9*
10-2	26,5±3,0*	106,8±4,5*	21,5±2,8*	46,2±2,6*	27,2±4,0*	57,5±2,7*	11,1±2,5*	11,4±0,9*

Примечание: * – изменения статистически достоверны при P ≤ 0,05

При pH 7,5 и 9,0 ионы кобальта в концентрации 10⁻⁸ М выступают в роли мощного активатора протеолитических систем. Наиболее выраженный лизис желатина и казеина зафиксирован в 0,15 М трис-НСl буфере при pH 9,0, увеличение в 2 и 1,5 раза соответственно по отношению к контролю.

В 0,15 М растворе NaCl, pH 7,5 желатинолитическая активность увеличивалась на 53,9 %, а казеинолитическая – на 19,4 % по отношению к контролю. В слабокислой среде такого эффекта не наблюдалось.

При низких концентрациях эффектора, активность протеаз гомогенатов может быть объяснена ролью Co²⁺ как кофактора металлопротеаз. Учитывая, что кобальт способен входить в активные центры ферментов или выступать в качестве аллостерического модулятора, видимо в малых дозах, он стабилизирует конформацию ферментных систем водоросли, способствуя более эффективному их связыванию с субстратом [2, с. 734].

С увеличением концентрации Co²⁺ от 10⁻⁸ М до 10⁻² М наблюдается последовательное и закономерное уменьшение активности протеаз водоросли на двух субстратах. В щелочной среде при концентрациях кобальта 10⁻⁵–10⁻² М лизис желатина снижался на 33,4–52,7 %, а казеина на 9,7–48,7 % по отношению к контролю.

В нейтральной среде в трис-НСl буфере подавление казеинолитической активности происходило более интенсивно по сравнению с раствором NaCl. Так, при концентрации Co²⁺ 10⁻² М актив-

ность в трис-HCl снизилась на 63,5 %, тогда как в NaCl – на 50,2 %. по отношению к контролю. Желатинолитическая активность в данных условиях по отношению к контролю снижалась на 56,7–57,8 % соответственно. Без эффектора протеолитическая активность гомогенатов в данных средах на желатине были близки (различие менее 5%), что свидетельствует о незначительном влиянии природы буфера на ферментативную активность в отсутствие кобальта.

Наибольшее подавление протеолитической активности зафиксировано в слабокислой среде (pH 5,5). В этих условиях наблюдалось достоверное дозозависимое снижение площадей лизиса для обоих субстратов в присутствии кобальта. При максимальной концентрации ионов металла желатинолитическая активность снизилась в 3,5 раза, а казеинолитическая – в 4,5 раза по сравнению с контролем.

Ионы кобальта в концентрации 10^{-8} М оказывают стимулирующее действие на протеолитическую активность гомогенатов клеток *P. diatomophyta* в нейтральных (pH 7,5) и щелочных (pH 9,0) средах. В концентрациях 10^{-6} М и выше ионы кобальта ингибируют действие протеаз водоросли.

Сравнение буферов с одинаковым pH 7,5 показало, что природа буферной системы оказывает более выраженное влияние на казеинолитическую, нежели на желатинолитическую активность.

Наиболее выраженное подавление протеолиза зафиксировано при pH 5,5 при максимальных концентрациях кобальта 10^{-2} М.

Наивысшая протеолитическая активность как в контроле, так и в опытных группах наблюдалась в нейтральном растворе NaCl pH 7,5, что согласуется с ранее установленной зависимостью действием протеиназ *P. diatomophyta* от pH среды.

Список использованных источников

1. Cura, H. Diatom Diversity and Its Environmental Drivers in Lakes of King George (62° S) and Horseshoe Islands (67° S) in the Maritime Antarctic / H. Cura, N. O. Guven // Water. – 2023. – Vol. 15, № 19.
2. Biswas, R.K. Diatoms: Miniscule biological entities with immense importance in synthesis of targeted novel bioparticles and biomonitoring / R.K. Biswas, A.K. Choudhury // Plant Science Today. – 2022. – Vol. 9, № 3. – P. 734–747.
3. Removal of the Basic and Diazo Dyes from Aqueous Solution by the Frustules of *Halamphora* cf. *salinicola* (Bacillariophyta) / A. Golubeva, P. Roychoudhury, P. Pomastowski [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 13.
4. Ничипорук, А.И. Выявление протеолитической активности у водоросли *Pinnularia Diatomophyta* / А.И. Ничипорук // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы XIX международной молодежной науч.-практ. конференции, Пинск, 17 апреля 2025 г. – Пинск : ПолесГУ, 2025. – Ч. 2. – С. 295–298.
5. Ильючик, И.А. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*) / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с
6. ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов. – Москва: Стандартинформ, 2018. – 13 с.